

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ISOLIERUNG VON
SCHWEINE-SERUMKALLIKREIN DURCH
AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE**

Brigitte Dittmann
—

1974
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41556029_0033

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. E. Werle

UNTERSUCHUNGEN ZUR ISOLIERUNG VON SCHWEINE-SERUMKALLIKREIN
DURCH AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin verfaßt
und einer Hohen Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität zu München

vorgelegt von
Brigitte Dittmann

aus
München

München 1972

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. H. Fritz
Prof. Dr. Dr. E. Werle

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.2.1974



Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie
und Klinische Biochemie der Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle
danke ich herzlich für die
großzügige Förderung meiner
Arbeit.

Besonders danken möchte ich
Herrn Priv.Do. Dr. H. Fritz
für zahlreiche Diskussionen
und wertvolle Anregungen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung	1
Einleitung und Zielsetzung	3
I Zur Enzymologie der Kallikreine	5
I/1 Zur bisherigen Kenntnis der Biochemie der Kallikreine, Abgrenzung gegen andere Enzyme	5
I/2 Das Serumkallikrein	6
I/2/1 Aktivitätseinheiten	7
I/2/2 Zur Physiologie und Pathophysiologie des Serumkallikreins	7
II Isolierung der Serumkallikreine	9
II/1 Übersicht	9
II/2 Isolierungsverfahren	10
II/2/1 Isolierung von Schweine-Serumkallikrein nach (1)	10
II/2/2 Isolierung von Schweine-Serumkallikrein nach (4)	10
II/2/3 Isolierung von Human-Plasmakallikrein nach Colman et al. 1969	12
II/2/4 Bemerkungen zu den Isolierungen	12

	Seite
II/3 Affinitätschromatographie	13
II/4 Unsere Methode der Isolierung von Kallikrein aus Schweineserum	15
II/4/1 Aktivierungs- und Isolierungsschritte vor der Affinitätschromatographie	16
II/4/2 Versuchsergebnisse, die sich aus der Nacharbeitung ergaben	19
II/4/3 Bemerkungen zu den Schritten 1 - 4	20
II/4/4 Vorversuche zur Affinitätschromatographie	21
II/4/5 Harzversuche an der Säule	25
II/4/6 Entsalzungs- und Stabilisierungsprobleme	28
 Diskussion des Isolierungsverfahrens	 31
 Ausblick	 33
 Literatur	 34

Zusammenfassung

Mittels einer einfachen, allgemein auf Serunkallikreine anwendbaren Methode wurde Schweine-Serunkallikrein isoliert. Neu entwickelt wurde dabei der Schritt der Affinitätschromatographie, der verschiedene andere Reinigungsverfahren einsparen hilft.

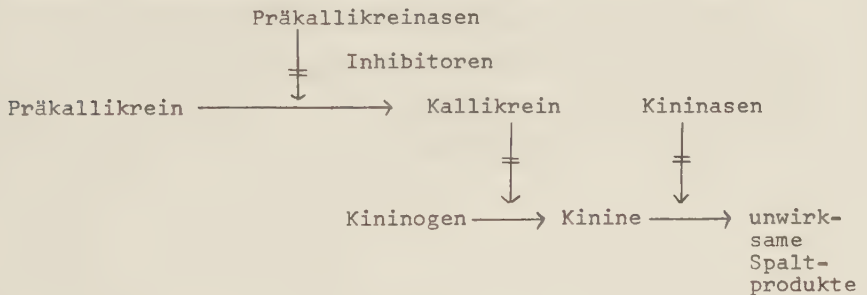
1. Die ersten Isolierungsschritte erfolgten nach Habermann und Klett (4).
 - a. Aktivierung des Serunkallikreins durch Casein.
 - b. Vorreinigung durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung u.
 - c. durch Fällung bei pH 4,6.
 - d. Weitere Auftrennung durch Gradientenchromatographie an DEAE-Sephadex A-50.
2. Anschließend wurde die Affinitätschromatographie als ergiebigster, neuer Reinigungsschritt eingeführt: Er ist deshalb von besonderer Bedeutung, da der an CM-Cellulose kovalent gebundene Inhibitor aus Sojabohnen (SBI) nur das Serunkallikrein bindet, während alle übrigen Begleitstoffe mit Salz-Pufferlösungen aus der Harzsäule ausgewaschen werden können.

3. Die Elution des Kallikreins aus der Säule gelang nach verschiedenen Vorversuchen am besten mit 2 M Harnstofflösungen. Der unlösliche Kallikrein-SBI-Harz-Komplex dissoziierte dabei fast vollständig.
4. Mittels einer Biogel P-2 Säule wurde anschließend der Harnstoff und auch eine hochmolekulare Proteinfraction (inaktive, assoziierte Kallikreinmoleküle) vom aktiven Serumkallikrein abgetrennt.
5. Je nach der entsprechenden Vorreinigung wurde mit der Affinitätschromatographie eine 100 - 300fache Anreicherung erzielt.

Einleitung und Zielsetzung

Trotz eingehender Forschung ist die eigentliche Rolle des Kallikrein-Kinin-Systems in Säugetierorganismen noch weitgehend ungeklärt (1,2,3). Es ist anzunehmen, daß es für biologische Prozesse auf Grund seiner pharmakologischen Wirkungen eine außerordentliche Bedeutung hat.

Aus dem Kininogen des Plasmas werden durch Kininogenasen, unter anderem durch Serunkallikrein, die Kinine, Polypeptide mit 9 - 11 Aminosäuren, liberiert, das wirksame Endprodukt des Wirkstoffkomplexes. Die Kinine werden in vivo rasch durch Kininasen abgebaut.



Kinine können pathologische Erscheinungen auslösen, wenn das Gleichgewicht der Kinin-Freisetzung und -Inaktivierung gestört

ist (1,23).

Viele experimentelle Forschungsergebnisse sind nur deshalb so unsicher, weil sie auf Untersuchungen mit nur teilweise gereinigten und daher ungenügend charakterisierten Einzelkomponenten beruhen.

Mit dem Ziel, ein Verfahren zu entwickeln, das größere Mengen der Kallikreine zu isolieren gestattet und ein noch reineres Produkt herzustellen, als es bisher möglich war, sollte diese Arbeit die Grundlagen für eine eingehende Erforschung der sehr spezifisch wirkenden Plasmakininogenase Serumkallikrein schaffen. Es sollte eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt, möglichst spezifisch, mit hohen Ausbeuten und geringem Aufwand Kallikrein aus dem Serum vom Schwein und später auch vom Menschen zu isolieren. Dabei erwies sich die Affinitätschromatographie als sehr günstig. Es galt dabei einige methodische Schwierigkeiten zu überwinden.

I. Zur Enzymologie der Kallikreine

I/1 Zur bisherigen Kenntnis der Biochemie der Kallikreine, Abgrenzung gegen andere Enzyme

Aus Kininogen liberieren Kallikreine verschiedener Herkunft - aus Serum, Darm, Harn und Drüsen - verschiedene Kinine. Z. B. setzt Plasmakallikrein Bradykinin (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH), dagegen Organ- und Harnkallikrein Kallidin (Lys-Bradykinin) frei.

Während die allgemeine Abgrenzung der Kallikreine von anderen Kininogenasen Schwierigkeiten bereitet, sind doch die einzelnen Vertreter der Kallikreingruppe weitgehend definiert. Pankreas- und Serumkallikrein vom Schwein unterscheiden sich von anderen Proteinasen wie Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin und Plasmin sehr stark hinsichtlich ihrer Molekulargewichte, des Hemmspektrums und der Substratspezifität (2). Serumkallikrein (MG bei 100 000) unterscheidet sich deutlich von den untereinander sehr ähnlichen Kallikreinen aus Harn, Glandula submandibularis und Pankreas (MG unter 33 000) (2).

I/2 Das Serumkallikrein

Man kann analog zur Blutgerinnung zwischen einer intrinsic und einer extrinsic Kininfreisetzung unterscheiden. In letzterer spielen Enzyme anderer Herkunft, z.B. der Gefäßwand eine Rolle. Der Hagemannfaktor (Faktor XII der Blutgerinnung) aus dem intrinsic-System und Trypsin aus dem extrinsic-System sind in der Lage das Präkallikrein, die inaktive Vorstufe, in aktives Kallikrein umzuwandeln. Aber der genaue Aktivierungsmechanismus ist noch unbekannt.

Aus den bisher publizierten Untersuchungsergebnissen (5,6,14) kann man schließen, daß wahrscheinlich nur ein natives Präkallikrein existiert. Bei der Aktivierung können aber eventuell verschiedene Isoenzyme mit gleicher biologischer Aktivität entstehen.

Serumkallikrein ist ein säure- und thermolabiles Enzym. Elektrophoretisch wandert es zwischen den β - und γ -Globulinen (4). Es ist ein Glykoproteid und enthält Neuraminsäure und Hexosen (4). Es ist in seiner Wirkung dem Trypsin sehr ähnlich. Es hydrolysiert N ^{α} -acylierte L-Argininreste und wird von DFP (Diisopropylfluorophosphat), TLCK (1-Chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanon) und anderen Trypsininhibitoren gehemmt. Infolge der Hemmbarkeit durch DFP ist anzunehmen, daß auch hier ein Serinrest im aktiven Zentrum für die Wirkung verantwortlich ist.

I/2/1 Aktivitätseinheiten

Zur Bestimmung der Aktivität des Serumkallikreins wird seine esterolytische und seine biologische Wirkungsweise herangezogen. Die esterolytische Aktivität wird in Internationalen Einheiten (U) angegeben. 1 U ist die Menge Enzym, die pro Minute ein μMol Substrat unter definierten Bedingungen spaltet.

Die biologische Kallikreineinheit ist durch die blutdrucksenkende Wirkung der durch Kallikrein freigesetzten Kinine definiert. Heute wird meist reines Pankreaskallikrein als Standard benutzt (4), aber eigentlich ist ein direkter Vergleich nicht erlaubt, da Serumkallikrein einen anderen Kininliberierungsmechanismus besitzt als Pankreaskallikrein.

I/2/2 Zur Physiologie und Pathophysiologie des Serumkallikreins

Die Plasmakinine besitzen eine außerordentlich hohe pharmakologische Aktivität. In extrem niedrigen Dosen wirken sie auf die glatte Gefäßmuskulatur erschlaffend. Die Folge ist ein scharfer systolischer und diastolischer Blutdruckabfall, begleitet von einem Anstieg des Herzminutenvolumens als reflektorische Antwort.

Die extravasale glatte Muskulatur bestimmter Hohlorgane z.B. von Uterus und Ileum wird im Tierexperiment direkt zur Kontraktion erregt. In vivo wurde steigende Magen-Darm-Tätigkeit und Bron-

chokonstriktion - besonders bei Asthmatikern - beobachtet. Es kann aber auch Erschlaffung bestimmter extravasaler glatter Muskulatur auftreten.

Die Kapillarpermeabilität wird erhöht, was zu Ödemen führen kann.

Kinine erregen freie Nervenendigungen und Nociceptoren, verursachen also Schmerzen, sie tragen zur Entstehung von Entzündungen mit dolor, calor, rubor, Leukozytenmobilisation und Phagozytose bei. Granulozyten enthalten kininfreisetzende Enzyme, was die Rolle bei Entzündungen noch zu bestätigen scheint.

Obwohl die physiologische Funktion des Serumkallikreins noch unbekannt ist, scheint doch seine Beteiligung bei einigen pathologischen Erscheinungen gesichert zu sein. Bei anaphylaktischen Reaktionen, bei Schockzuständen infolge von Verbrennungen und Traumata, beim Endotoxinschock, bei Asthma, bei Pankreatitis und bei Bluttransfusionsreaktionen spielt Serumkallikrein eine Rolle, außerdem bei vielen akuten und chronischen Allergien und Entzündungen, bei Arthritiden und bei Gicht (Urate und Calciumphosphatkristalle aktivieren den Hagemann-Faktor, der dann über Serumkallikrein zur Freisetzung von Kininen führt). Kininfreisetzung durch besondere Substanzen wie Kaolin und Kieselerde führen zu Fremdkörpergranulomen. Bestimmte Carcinoide aktivieren Kallikrein, die resultierenden Kinine tragen dann wahrscheinlich wieder zu vermehrtem Wachstum bei. Hereditäre, angioneurotische Ödeme be-

ruhen auf einem Mangel an C1-Esterase-Inhibitor, einem Kallikreininhibitor.

II Isolierung der Serumkallikreine

II/1 Übersicht

Das inaktive Präkallikrein, das in allen untersuchten Säugetierplasmen vorkommt, kann im Plasma aktiviert werden durch Behandlung mit Aceton (1), Alkohol (7) und anderen organischen Lösungsmitteln, durch Ansäuern (1), durch Casein (1,4) und Antigen-Antikörper-Präzipitate (8), durch Ammoniumsulfat (2), durch Zugabe von Trypsin, Papain und Plasmin (1,2), durch Verdünnung (3) und durch Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen wie Glas, Kaolin u.a. (2,5,6). Serumkallikreine wurden isoliert aus Serum und/oder Plasma vom Mensch (2,3,7,8), Schwein (1,4), Rind (9), Kaninchen (12), Pferd (10) und Meerschweinchen (11). Der Gehalt an Plasmakallikreinen ist bei den verschiedenen Spezies verschieden hoch. Tabelle I zeigt die Plasmakallikreinaktivität in den Seren verschiedener Spezies.

Serum	KE/ml	Serum	KE/ml
Schwein	10	Rind	0,5
Ratte	5	Hund	< 1
Mensch	3-4	Meerschwein- chen	≤ 1

Tabelle I

II/2 Isolierungsverfahren

II/2/1 Isolierung von Schweine-Serumkallikrein nach (1)

Trautschold und Werle (1963) (1) isolierten aus Casein-aktiviertem Schweineserum ein Kallikrein mit der spezifischen biologischen Aktivität von 60 - 100 KE/mg. Die Ausbeute lag bei 10 - 20%. Nach Ammoniumsulfatfraktionierung wurde das Produkt zweimal an Sephadex G-100 chromatographiert. Kallikrein mit einer spezifischen Aktivität von 60 KE/mg war noch stabil, mit 100 KE/mg dagegen sehr labil.

II/2/2 Isolierung von Schweine-Serumkallikrein nach (4)

Habermann und Klett (1966) isolierten aus caseinaktiviertem, defibriniertem Schweineserum ein sehr reines Kallikrein mit einer spezifischen Aktivität von 22 TAME U/mg bzw. 28,5 BAEE U/mg und der biologischen Aktivität von 60 KE/mg. Das Enzym erwies sich als homogen in der Ultrazentrifuge, bei der Elektrophorese und

hinsichtlich des Elutionsvolumens bei der Gelfiltration an Sephadex G-100. Die Tabelle II zeigt die Daten der Isolierung. Ein Fließschema der Aufarbeitung ist in Schema I links aufgeführt.

Schritt	Behandlung	Protein	TAME	Biol. Aktiv.	Anreiche- rungs-faktor	Aus- beute
		mg	U/mg	E/mg		%
1	Caseinfällung	75 500	0,25	0,4	(1,0)	100
2	Ammoniumsulfatfällung (30-60%ige Sättigung)	32 500	0,325	0,75	1,9	81
3	Fällung bei pH 4,6, Über- stand	20 500	0,63	0,94	2,4	64
4	DEAE-Sephadex A-50	1 990		13,7	34	47
5	Sephadex G-200	332		51	128	29
6	P-Cellulose	63		120	300	25
7	Sephadex G-100	7	22,2	206	515	4,7

Tabelle II

Als Standard der biologischen Aktivität diente die lyophilisierte Fraktion III. 1 mg entsprach einer biologischen Einheit (Hundeblutdrucktest).

II/2/3 Isolierung von Human-Plasmakallikrein nach Colman et al. 1969

Die Isolierung von Human-Plasmakallikrein nach Colman gelang 1969 durch Cohn-Fraktionierung von frischem ACD Plasma, Alkoholfällung der Cohn-Fraktion IV-1 (19), gefolgt von Chromatographie an CM-*Se-phadex* C-50 und an DEAE-Cellulose. Aber dieses Verfahren ist aufwendig, die Ausbeuten liegen im Promille-Bereich und die spezifische Aktivität der erhaltenen Kallikreinpräparate ist relativ niedrig.

II/2/4 Bemerkungen zu den Isolierungen

Die Methode von Habermann et al. schien uns am besten geeignet für eine Nacharbeitung. Die Aktivität des erhaltenen Produktes liegt sehr hoch, auch ist die Ausbeute relativ gut. Wir konnten die aufwendigen Chromatographien durch einen spezifischen Anreicherungsschritt wesentlich verkürzen und die Ausbeuten erhöhen. Diese spezifische Anreicherung wurde uns durch die Affinitätschromatographie ermöglicht. Wir verwendeten einen wasserunlöslich gebundenen Inhibitor aus Sojabohnen, der als relativ spezifischer Inhibitor für Serunkallikrein gilt (1,2,4).

II/3 Affinitätschromatographie

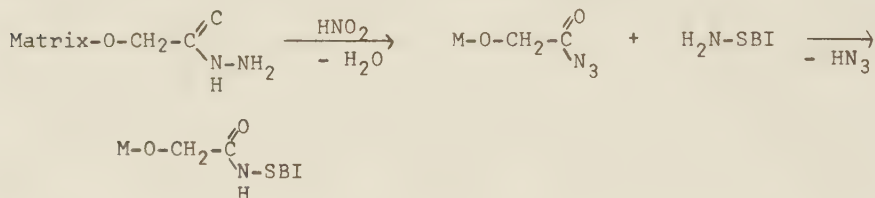
Bei der Gel- und Ionenaustauschchromatographie (17,18) wird nach Molekülgröße bzw. -ladung aufgetrennt. Im Gegensatz dazu werden bei der Affinitätschromatographie biologisch aktive Proteine nach ihrer Affinität zu wasserunlöslich gebundenen Liganden sortiert (13,14,15,16) und selektiv angereichert. Bei diesem Verfahren ist an einen wasserunlöslichen Träger ein Enzym, ein Inhibitor, ein Antigen oder ähnliches kovalent gebunden.

Die Trägermatrix muß dabei bestimmten Anforderungen genügen. Sie muß ausreichend stabil sein, muß ein weitmaschiges Netzwerk besitzen und den Liganden in ausreichender Menge kovalent binden. Eine unspezifische Wechselwirkung mit Proteinen ist nicht erwünscht. Als Trägermatrix werden vor allem Cellulose, Agarose, quervernetzte Dextranderivate (Sepharose) und Polyacrylamidgele verwendet.

Der Ligand muß ohne Aktivitätsverlust an den Träger gebunden werden können und aus sterischen Gründen genügend Abstand zur Matrix haben, was durch den Einbau von Zwischengliedern, sog. "spacers" erreicht wird. Der Ligand sollte die entsprechenden Proteine spezifisch binden.

Der Ligand kann mit den üblichen peptidchemischen Methoden an die

Matrix gebunden werden. Wasserunlösliches Carboxymethylcellulose-Hydrazid wird mit salpetriger Säure zum Azid oxydiert, das dann mit dem Inhibitor aus Sojabohnen (SBI) umgesetzt wird. Der Inhibitor wird so kovalent an die Matrix gebunden.



Das Inhibitorharz wird nun gründlich mit Salz-Pufferlösungen gewaschen und kann dann mit dem Enzym beladen werden. Inaktive und für den Inhibitor unspezifische Proteine werden nicht gebunden und können ausgewaschen werden. Zum Beladen und Auswaschen werden Puffer mit erhöhter Salzkonzentration verwendet, um unspezifische Assoziationen mit der Matrix zu vermeiden.

Das Ablösen des Enzyms erfolgt evt. bei hoher Salzkonzentration, zumeist jedoch durch pH-Änderung, reversibel denaturierende Substanzen (Harnstoff, Guanidin) oder durch reversible Hemmstoffe. Nach Dialyse oder Gelchromatographie des Eluats erhält man das gewünschte Enzym stark angereichert.

II/4 Unsere Methode der Isolierung von Kallikrein aus Schweineserum.

Schritte	Methode nach Habermann	Unsere Methode
	Blut Zentrifugation 3000 g	
1	Serum Aktivierung durch Casein	
2	Niederschlag Ammoniumsulfatfällung bei 30 - 60% Sättigung	
3	Niederschlag Fällung mit Essigsäure pH 4,6	
4	Überstand Fraktionierung an DEAE-Sephadex	Affinitätschromatographie an SBI-CM-Cellulose
5	Aktive Eluate Fraktionierung an Sephadex G-200	Binden Ablösen
6	Aktive Eluate Fraktionierung an P-Cellulose	Harnstoff 2 M
7	Aktive Eluate Fraktionierung an Sephadex G-100	Aktive Eluate Entsalzung Biogel P-2 Dialyse
8	Aktive Eluate Entsalzung oder Dialyse	gereinigtes Serumkallikrein
	Reines Serumkallikrein	

II/4/1 Aktivierungs- und Isolierungsschritte vor der Affinitätschromatographie

Frisches Blut vom Schwein wird in Plastikgefäßen gesammelt und etwa 1/2 - 1 Stunde der Gerinnung überlassen. Anschließend wird das Serum vom Blutkuchen abgehebert und 20 Minuten bei 3000 g und 4°C zentrifugiert. Das Serum wird erneut abgehebert. Gering hämolytisches Serum beeinträchtigt die Isolierung von Serumkallikrein nicht.

Schritt 1: Aktivierung durch Adsorption an Casein

3 l Serum werden mit 15 l einer 0,5%igen Caseinlösung (mit 1 N NaOH in Lösung gebracht) verdünnt. Der pH-Wert wird durch Zugabe von 1 N Essigsäure auf 5,0 eingestellt, wobei das Caseinadsorbat ausfällt. Das feinflockige Präparat wird nach 1-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur vom klaren Überstehenden getrennt und bei pH 7,5 durch Zugabe von 1 N NaOH ad 3 l gelöst.

Schritt 2: Ammoniumsulfat-Fraktionierung

Dem gelösten Caseinpräzipitat wird bis zu einer Sättigung von 30% festes Ammoniumsulfat zugesetzt. Der entstehende voluminöse Niederschlag enthält wenig Serumkallikrein und wird abzentrifugiert. Die Fällung, die bei 60% Sättigung entsteht wird nach kurzem Stehen abgetrennt und in dest. Wasser ad 1000 ml gelöst. In ihr sind über 80% der biologischen Aktivität enthalten, bezogen auf das Produkt von Schritt 1. Im Überstehenden verbleibt nur wenig Protein und keine nennenswerte Kallikreinaktivität.

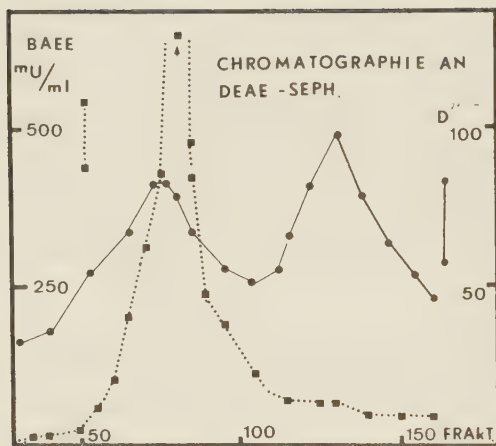
Schritt 3 Fällung bei pH 4,6

Die wässrige Lösung der zwischen 30 und 60% Ammoniumsulfatsättigung fallenden Niederschläge wird mit 1 N Essigsäure auf pH 4,6 angesäuert, das dabei entstehende Präzipitat abzentrifugiert und mit 0,1 M Natriumacetat Puffer, pH 4,6, nachgewaschen. Überstehendes und Waschflüssigkeit werden vereinigt, gegen Wasser dialysiert und gefriergetrocknet oder bei sofortiger Weiterverarbeitung nach Schritt 4 gegen den hier verwendeten Anfangspuffer dialysiert.

Schritt 4 Chromatographie an DEAE-Sephadex A-50

Der schwach basische Anionenaustauscher vermag große Mengen an Begleitproteinen zu binden. Er wird deshalb verwendet, um die Ausbeute bei der Affinitätschromatographie zu erhöhen (zu große Mengen Begleitsubstanzen "reißen" beim Auftragen Kallikrein mit).

In eine gekühlte ($0-4^{\circ}\text{C}$) Säule (4×43 cm) wird DEAE-Sephadex A-50 gefüllt, das vorher mit 0,0025 M Phosphatpuffer, pH 6,8 äquilibriert war und noch mehrere Stunden mit diesem Puffer durchgespült. Nach dem Auftragen des Überstehenden von Schritt 3 wird mit einem linearen Gradienten aus 1000 ml Äquilibrierpuffer und 1000 ml 0,2 M Phosphatpuffer pH 6,8 entwickelt.



Elutionsdiagramm

Die Proteinelution wurde am "Uvicord" aufgezeichnet. Die estero-
lytische Aktivität des Serumkallikreins ist in mU/ml angegeben.

II/4/2 Versuchsergebnisse, die sich aus der Nacharbeitung ergaben

Schritte 1 - 3 nach Habermann

Ausgangsmenge der jeweiligen Versuche war 9 l Serum, die Werte sind auf 1 l Serum berechnet.

Versuch	Lyophilisat g/l	U	KE	Verhältnis der Aktivitäten
1	3	380	480	8 : 1
2	6,3	560	120	46 : 1
3	2,9	235	130	18 : 1
4	10,4	830	1040	8 : 1

Tabelle III

Schritt 4 nach Habermann

Eingesetzt wurden 10 g lyophilisierte Substanz aus Versuch 4, einer biologischen Aktivität von 1000 KE entsprechend. Im Schnitt wurden dabei 2 - 3 g lyophilisierte Substanz erhalten. Was die biologische Aktivität anbelangt, betrug die Ausbeute im Eluat bei den besten Versuchen 100%. Die Ergebnisse beziehen sich auf 1 l Serum Ausgangsmenge.

Versuch	Eluat ml	Gesamtaktivität U	KE	Ausbeute U % KE %	Protein Gesamt g
5	1140	890	302	100 30	2
6	870	695	726	87 73	2,5
7	560	560	784	70 78	2,3
8	910	637	1092	80 100	3,5

In Versuch 8 wurden 1097 KE eingesetzt.

Tabelle IV

II/4/3 Bemerkungen zu den Schritten 1 - 4

Die Verarbeitung so großer Serummengen - jeweils 9 l - war ungünstig, da sich die einzelnen Aufarbeitungsschritte dadurch sehr in die Länge zogen. Das Serumkallikrein war dadurch oft zu lange einem sauren pH ausgesetzt (Schritt 1 und 3). Vielleicht wäre es dann auch besser gewesen, unter Kühlung zu arbeiten. Versuch 2 und 3 zeigen die dadurch bedingten Aktivitätsverluste am deutlichsten - im Vergleich zu Versuch 1, der mit 1 l Serum durchgeführt wurde.

Außerdem muß man strengdarauf achten, daß das zur Dialyse verwendete deionisierte Wasser keinen sauren pH aufweist. Es muß mit Ammoniak auf pH 7 eingestellt sein.

Bei Versuch 2 war die Sättigung der ersten Ammoniumsulfatfraktion

im Schritt 2 etwas zu hoch gewählt, so daß der Niederschlag der zweiten Fraktion äußerst spärlich ausfiel. Er war feinflockig und schwer zentrifugierbar, was die niedrige Ausbeute erklärt.

Bei Schritt 3 war bei allen Versuchen niemals ein Niederschlag durch Ansäuern mit 1 N Essigsäure ausgefallen (Habermann et al. gibt bereits an, daß der Niederschlag sehr unterschiedlich ausfällt). Erst bei der Dialyse bildete sich in den Schläuchen eine flockige Fällung, die dann abzentrifugiert werden konnte.

Die hohe Ausbeute von Versuch 4 erklärt sich durch die Aufarbeitung eines etwas hämolytischen Serums, was aber die Aktivitätsausbeute nicht beeinträchtigte. Der braune Farbstoff wurde im Schritt 4 an der DEAE-Sephadex A-50 Säule abgetrennt.

II/4/4 Vorversuche zur Affinitätschromatographie

Die Versuche wurden mit dem vorgereinigten Produkt aus Schritt 4/ Versuch 7 durchgeführt.

Als Inhibitorharz wurde ein Inhibitor aus Sojabohnen, polymer gebunden an CM-Cellulose der Fa. E. Merck, Darmstadt, verwendet.

Die Vorversuche wurden unter Eiskühlung mit 100 mg Harz im Batchverfahren durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde das Harz dreimal je 30 Minuten mit Puffer (0,5 M NaCl, 0,1 M TRA, pH 7,5) unter Rühren gewaschen. Im Versuch 1 sollte geprüft werden, ob Serumkallikrein überhaupt vom Harz gebunden wird. Dazu wurde das Harz

mit 5 mg Serumkallikrein, gelöst in 2 ml Puffer, 1 Stunde unter Eiskühlung und Rühren inkubiert - in einer späteren Versuchsreihe wurde gezeigt, daß eine Inkubation von 30 Minuten ausreichend ist. Es ergab sich eine Bindung von 86%.

Weiter mußte die Stabilität von Serumkallikrein gegenüber Pufferlösungen verschiedener Molarität und H^+ -Ionenkonzentration, die dann evt. zur Ablösung herangezogen werden könnten, geprüft werden.

Die Stabilität nahm in folgender Reihenfolge zu (Kontrollmessungen erfolgten nach 4 Std.):

Harnstoff 6 M, pH 6 < 6 M, pH 7 < 4 M, pH 7 < 2 M, pH 7

Guanidin-HCl 4 M, pH 6 < 4 M, pH 7 < 2 M, pH 6 < 2 M, pH 7 < 1 M, pH 7 < 0,5 M, pH 6 < 0,5 M, pH 7

Nun mußte versucht werden mit den Pufferlösungen, denen gegenüber die weitgehend größte Stabilität bestand, das Serumkallikrein wieder abzulösen. Dies gelang in den Versuchen 3 und 4 mit 4 M Harnstofflösung, pH 7,0. Es wurde sogar eine Ablösung von 100%, bezogen auf die gebundene Menge, erreicht. Der erste Versuch dieser Art (V2) war völlig fehlgeschlagen. Der Grund hierfür war wahrscheinlich eine zu wenig sorgfältige Kühlung und Glasabsorption. In den Versuchen 3 und 4 wurde deshalb die eingesetzte Serumkallikreinmenge auf 10 mg erhöht, besser gekühlt und das Eluat unverdünnt getestet. Zur Inkubation wurde das Harz mit einer 0,25%igen

Lösung von Serumkallikrein gerührt. Anschließend wurde mit insgesamt 10 ml TRA-Puffer in 3 Anteilen gewaschen. Zur Ablösung von Serumkallikrein wurde das Harz 2 ml 4 M Harnstofflösung, pH 7,0 unter Rühren ausgesetzt. Zur weiteren Ablösung wurde mit 1 M Guanidin-HCl-Lösung, pH 7,0 nachgewaschen. Nach den einzelnen Schritten wurde jedesmal abzentrifugiert.

In den Versuchen 5 - 7 wurde das Batchverfahren in einem etwas größeren Maßstab durchgeführt (330 mg Harz, 30 mg Serumkallikrein). Zunächst wurde versucht nach der Harnstoffelution mit TRA-Puffer nachzuwaschen. Die Ausbeute konnte aber nicht erhöht werden (V5 und V6). Sie lag bei 50 - 60%, bezogen auf die gebundene Menge und bei 15 - 20%, bezogen auf die aufgetragene Menge.

Bei Versuch 6 wurde eine Dialyse mit Ammoniakwasser, pH 7, abgeschlossen. Es zeigte sich eine Aktivitätsverdoppelung im BAEE-Test.

Die biologische Aktivität im Blutdrucktest am Hund war vor und nach der Dialyse gleich groß. Die biologische Aktivität entsprach genau der esterolytischen Aktivität nach der Dialyse.

Versuch 7 zeigt, daß mit 2 M Harnstofflösungen genausoviel ablösbar ist wie mit 4 M Harnstofflösungen. Erstmals wurde auch mit derselben Salzlösung nachgewaschen, was eine Erhöhung der Ausbeute um das 2 - 3fache brachte. Bezogen auf die gebundene Menge wurden 87% abgelöst. Somit war der Weg zur Affinitätschromatographie auf Säulen geebnet. 2 M Harnstofflösung, pH 7,0, stellte also den besten

Kompromiß dar zwischen zu starker Denaturierung des Serumkallikreins durch höhermolekularen Harnstoff und zu geringer Denaturierung, was zu geringer Dissoziation des unlöslichen Komplexes zur Folge hätte. Bereits die mäßige Denaturierung des Serumkallikreins durch die 2 M Harnstofflösung hat die Bildung inaktiver hochmolekularer Kallikreinmoleküle zur Folge.

Bei der Entsalzung des Eluats waren noch Verbesserungen notwendig, es traten noch zu große Verluste auf.

Da durch das Nachwaschen mit TRA-Puffer verhältnismäßig viel Serumkallikrein ablösbar war, wurde versucht, allein durch Erhöhung der Salzkonzentration (2 M KCl, 0,05 M TRA, pH 7,0) dieselbe Ausbeute zu erzielen. Dies gelang aber nicht. Es wurde etwa nur die Hälfte der vorherigen Menge abgelöst.

Tabelle V Harzvorversuche im Batchverfahren

	Aufgetragen		Überst.+Waschl.		gebunden		abgelöst		Ausbeute
	[mg]	[U]	[U]	[U]	[U]	[%]	[U]	[%]	
V1	5	1,3	0,2						
V2	5	0,8	0,2	0,2					
V3	10	1,8	1,1	0,2	0,5	26	0,2/ 58 0,08		15
V4	10	1,4	0,8	0,2	0,4	23	0,3/ 100 0,09		23
V5	30	5,2	2,3	1,0	1,8	35	0,7/ 54 0,3		19
V6	30	5,8	3,4	1,0	1,4	24	0,6/ 64 0,3		15
V7	30	4,7	2,0	1,0	1,6	34	0,7/ 87 0,7		30

II/4/5 Harzversuche an der Säule

Eine kleine gekühlte Säule (2 x 10 cm) wurde mit 1 g Harz beschickt, das vor der ersten Verwendung 5mal mit TRA-Puffer (0,5 M NaCl, 0,1 M TRA, pH 7,5), 5mal mit 2 M Harnstofflösung, pH 7,0 und anschließend noch 2mal mit TRA-Puffer je 10 Minuten im Batchverfahren gewaschen wurde. Anschließend wurde noch in der Säule mit diesem Waschpuffer äquilibriert.

Da der erste Versuch wegen zu starker Quellung des Inhibitorharzes fehlschlug, wurde es mit Cellulosepulver (Nr.123, Schleicher & Schüll) im Volumenverhältnis 1:1 vermischt, um eine bessere Durchflußrate zu erzielen. Das Harz wurde nach jedem Versuch mit TRA-Puffer vom inaktiven Protein freigewaschen und konnte so mehrmals hintereinander (für alle 10 Versuche) verwendet werden. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 38 ml/h.

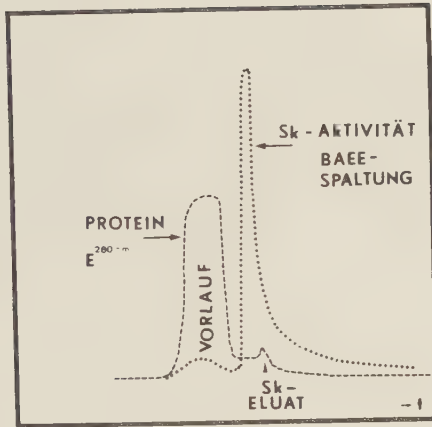
Es wurden immer 200 mg Serunkallikrein (vorgereinigtes Produkt aus Schritt 4/Versuch 7), ungefähr 37 U entsprechend, aufgetragen - gelöst in 40 ml TRA-Puffer. Die Lösungen müssen unbedingt klar sein, damit keine Verstopfung der Säule auftritt. Die Bindungskapazität von 1 g Inhibitorharz liegt bei etwa 30 BAEE U (2c), somit lagen die Versuche etwa im optimalen Bindungsbereich. Bei größeren Mengen eingesetzten Kallikreins würde sich die Ausbeute prozentual erniedrigen.

Je besser vorgereinigt die aufgetragenen Kallikreinlösungen sind,

desto geringer ist die Protein-Protein-Assoziation, wodurch die Menge des "mitgerissenen" Kallikreins bei der Beladung der SBI-Harz-Säule stark vermindert ist. Im Schnitt befanden sich dann noch 0,95 U im Vorlauf. Mit 60 ml TRA-Puffer wurden noch circa 1,6 U ausgewaschen. Die gebundene Menge betrug demnach 34,5 U = 93% (alles Mittelwerte aus 10 Versuchen (8-17)). Entwickelt wurde mit etwa 200 ml 2 M Harnstofflösung, pH 7,0. Im Schnitt wurden 23,7 U eluiert, das sind 68%, bezogen auf die gebundene Menge. Der höchste Wert betrug 36 U = 89%, der niedrigste 16,5 U = 49%.

Auffallend war von Anfang an die geringe Aktivität im Vorlauf und in der Waschflüssigkeit - im Vergleich zum Batchverfahren - was auf eine höhere Bindungskapazität in der Harzsäule hinweist.

Das Elutionsdiagramm zeigt an einem Beispiel den Verlauf des Beladens und Auswaschens der SBI-Harz-Säule, sowie der Eluierung des Kallikreins mit Harnstoff. Man sieht hier eindrucksvoll die hohe durch die Affinitätschromatographie erzielbare Anreicherung. Die Proteinelution wurde am "Uvicord" aufgezeichnet. Die estero-lytische Aktivität ist in Einheiten pro ml angegeben.



Elutionsdiagramm

Harzversuche mit der Säule

Tabelle VI

Aufgetragen		Vorlauf + Waschfl.		gebunden		abgelöst		Ausbeute %	
[U]		[U]	[U]	[U]	%	[U]	%	vor	nach
								Entsälzung	
V8	36	0,7	1,5	17	94	28	83,5	78	48
V9	38,5	0,8	1,1	36,5	95	26,2	71	68	55
V10	35,5	0,5	1,2	34	95	17,3	51	48	13
V11	39	0,9	1,3	37	92	26	71	67	-
V12	45	1,4	2,9	40	90	36	89	80	52
V13	34	0,8	1,3	32	94	16,5	49	52	56
V14	35,5	1,0	1,7	33	92	27,7	84	78	57
V15	36,5	0,9	1,5	34	93	19,9	59	55	-
V16	36,5	0,8	1,3	34,5	94	17,3	50	47,5	74
V17	34,5	1,1	2,0	31,5	92	21,9	70	63	75
Mittelwert									
	37	0,95	1,6	34,5	93	23,7	68	64	

II/4/6 Entsälvungs- und Stabilisierungsprobleme

Große Schwierigkeiten machte die Entsälvung des Harnstoffeluats.

Eine einfache Dialyse mit 1/1000 M Ammoniumazetatpuffer, pH 7 oder Ammoniakwasser, pH 7,0 war unzureichend (Versuch 8 und 9). In dem lyophilisierten Serumkallikrein war noch zuviel Harnstoff enthalten

außerdem mußte bei der Lyophilisation ein Aktivitätsverlust von 75% hingenommen werden.

Deshalb wurde versucht, den Harnstoff mittels Ultrafiltration und über eine G-50-Säule zu entfernen. Dazu wurde das Eluat von Versuch 10 mittels Ultrafiltration sehr stark eingeeengt und auf eine G-50-Säule aufgetragen. Als Eluiermittel wurde Ammoniakwasser, pH 7, verwendet. (Die Stabilität von Serumkallikrein gegenüber diesem Eluiermittel wurde vorher geprüft.) Nach der Lyophilisation waren wieder enorme Verluste zu verzeichnen (nur 13% Ausbeute). Es wurde deshalb an eine Selbstverdauung gedacht.

Aber dieser Verdacht ließ sich nicht bestätigen.

In einem erneuten Versuch (12) wurde das Eluiermittel an der G-50-Säule gewechselt: Phosphatpuffer, 0,2 M NaCl, 0,02 M Phosphat, pH 7,8 und eine Dialyse gegen 1/1000 M Phosphatpuffer, pH 7,5 angeschlossen. Dies brachte eine Ausbeute von 52%. Aktivitätszunahme nach Harnstoffelimination etwa 28%!

Weiter wurde versucht (13) nur mit einer Ultrafiltration den Harnstoff zu entfernen. Das Harnstoffeluat wurde einmal stark eingeeengt und dann etwa 1,5 l Phosphatpuffer (0,1 M NaCl, 0,01 M Phosphat, pH 7,8) durchlaufen gelassen. Anschließend wurde noch zweimal eingeeengt. Es konnte wieder eine Aktivitätszunahme um etwa 14% registriert werden. Ausbeute 56%.

Da bei all diesen Versuchen starke Glasabsorption festgestellt wurde, wurde von nun an mit einer Plastiksäule 2 x 40 cm gearbeitet. Die Beschickung erfolgte mit Biogel P-2. Beschichtet wurde

mit dem stark eingeeengten Harnstoffeluat. Zur Entwicklung diente ein Phosphatpuffer: 0,2 M NaCl, 0,02 M Phosphat, pH 7,8. Bereits nach 20 Minuten erschien das Serumkallikrein im Eluat, gleich anschließend, aber scharf getrennt, der Harnstoff. Diese Methode schien optimal zu sein, es war eine einwandfreie Trennung von Serumkallikrein und Harnstoff möglich. Es wurden Ausbeuten bis zu 75% erzielt. Auch hier war wieder eine Aktivitätszunahme bis zu 56% nach der Harnstoffelimination zu verzeichnen.

Das bei der Affinitätschromatographie erhaltene Serumkallikrein erwies sich als sehr instabil. Nach 2wöchiger Lagerung im Kühlschrank zeigte es erniedrigte esterolytische Aktivität. Nach Einfrieren (Trockeneis/Methanol oder Tiefkühltruhe) konnte eine um ca. 30% erniedrigte Aktivität des Serumkallikreins festgestellt werden. Beim Lyophilisieren trat ein weiterer Aktivitätsverlust von insgesamt 50 - 60% auf. Es sind weitere Versuche zur Stabilisierung des gereinigten Serumkallikreins notwendig.

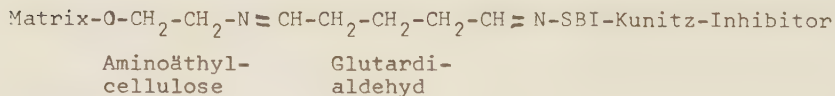
Als spezifische Aktivität wurde nach der BAEE/ADH-Methode 30,5 U/mg bestimmt (20). Die gefundenen spezifischen Aktivitäten sind vergleichbar mit dem von Habermann (4) ermittelten Wert von 28,5 U/mg nach der direkten BAEE-Methode. Die biologischen Aktivitäten, ermittelt beim Hundeblutdrucktest betragen 6 - 12 KE/mg.

Diskussion des Isolierungsverfahrens

Mittels der Affinitätschromatographie wurde ein Verfahren entwickelt, das zum ersten Mal erlaubt, die relativ hochmolekularen Kallikreine aus Seren von Schwein, Mensch und anderen Säugetieren spezifisch und mit wenigen Schritten zu isolieren. Das Verfahren stellt eine wesentlich Vereinfachung der bisherigen Isolierungsmethoden bei gleichzeitiger beträchtlicher Ausbeutesteigerung dar. Die Schritte 5 - 7 nach Habermann und Klett (Fraktionierung an Sephadex G-200, P-Cellulose und Sephadex G-100) konnten eingespart werden. Das nach Schritt 1 - 4 (Habermann und Klett) erhaltene vorgereinigte Serumkallikrein wird spezifisch an eine Kunitz-SBI-Cellulose gebunden, die Begleitsubstanzen werden mit Salz-Pufferlösungen ausgewaschen, die Dissoziation des wasserunlöslichen Kallikrein-SBI-Komplexes erfolgt durch Einwirkung einer Proteine reversibel denaturierenden und damit die spezifischen Bindungskräfte lösenden 2 M Harnstofflösung. Der Anreicherungsfaktor beim Affinitätschromatographieschritt liegt bei 100 - 300. Die Endausbeuten (ca. 50 - 60% bei der Vorreinigung und 85 - 95% beim Affinitätschromatographieschritt) dürften unter optimalen Bedingungen bei 30 - 40% liegen (bei den vorliegenden Versuchen bei 20 - 30%, bisher 0,08 - 4,7%), was außer der Arbeitersparnis einen wesentlichen Fortschritt gegenüber den bisher verwendeten Isolierungsverfahren bedeutet.

Auf den erzielten hohen Reinheitsgrad weist die extreme Empfindlichkeit der isolierten Kallikreine hin. Beim Versuch, die isolierten Kallikreine einzufrieren oder zu lyophilisieren, traten erhebliche Aktivitätsverluste (30 - 60%) auf. Auch der Kontakt mit nicht silikonisierten Glasoberflächen war tunlichst zu vermeiden, um nicht unkontrollierte Verluste hinnehmen zu müssen.

Das eingesetzte Inhibitorharz war für die durchgeführten Versuche noch keineswegs optimal. Es enthielt keinen "spacer" und der zur Harzherstellung verwendete "Inhibitor aus Sojabohnen" bestand, wie später festgestellt wurde, nur zu etwa 10% aus dem gegen Serumkallikrein wirksamen Kunitz-Inhibitor (20). Zu 90% besteht der fixierte "Inhibitor aus Sojabohnen" aus dem sog. Bowman-Birk-SBI-Inhibitor, der Serumkallikrein nicht hemmt. Inzwischen wurde ein verbessertes Inhibitorharz hergestellt. In ihm ist der Kunitz-Inhibitor aus Sojabohnen über einen "spacer" polymer an Aminoalkylcellulose gebunden.



Mit diesem Inhibitorharz hat sich eine wesentlich höhere Bindungskapazität ergeben.

Ausblick

Dieses neue Isolierungsverfahren ist prinzipiell für alle Serumkallikreine anwendbar.

Inzwischen ist es gelungen, den wasserunlöslichen Kallikrein-SBI-Komplex mit Benzamidin, einem kompetitiven Hemmstoff, noch schonender zu dissoziieren. Die entwickelte Methode wird mit entsprechenden Modifikationen allgemein für die Isolierung anderer Proteinasen wie Plasmin, Hagemann-Faktor, Akrosin und Organ-Kallikreine anwendbar sein. Ebenfalls durch Affinitätschromatographie wird man die erhaltenen Serumkallikreine in einzelne Isoenzyme auftrennen können. Durch die Erhöhung der Ausbeute ist der Weg frei für die Isolierung größerer Kallikreinemengen und damit für die biochemische Charakterisierung.

Literatur

- 1 E. K. Frey, Kraut, H., Werle, E., "Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren". F. Enke, Stuttgart (1968).
- 2 Hrsg. E. Erdös: Handbuch der experimentellen Pharmakologie XXV, "Bradykinin, Kallidin and Kallikrein".
- 3 M. E. Webster, Fed. Proc. 27, 84 (1968).
- 4 E. Habermann u. W. Klett, Biochem. 2.346, 133 (1966).
- 5 R. Jahrreiss and E. Habermann, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharm. 269, 85 (1971).
- 6 E. Habermann and R. Jahrreiss, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharm. 269, 101 (1971).
- 7 R. W. Colman, Rattler, L., Sherry, S., J. Clin. Invest. 48, 11 (1969).
- 8 H. Z. Movat, Poon, M. C., Takeuchi, J., Int. Arch. All. Immun. 40, 89 (1971).
- 9 S. Nugasawa, Horiuchi, K., Yano, M., Suzuki, T., J. Biochem. (Tokyo) 62, 398 (1967).

- 10 O. B. Henriques, Lavras, A. A. C., Fichman, M., Picarelli, Z. P., Biochem. Pharmacol. 15, 31 (1966).
- 11 Davies, Lowe, Nature 198, 94 (1963).
- 12 V. P. Zykova, Puskina, T. S., Dokl. Acad. Nauk. USSR 165, 1439 (1965).
- 13 G. Feinstein, Naturwiss. 58, 389 (1971).
- 14 Cuatrecasas, J. Biol. Chem. 245, 3059 (1970).
- 15 Cuatrecasas and Anfinsen, Methods in Enzymology XXII, 345 (1971).
- 16 H. Orth, Angew. Chem., in Vorbereitung.
- 17 Sephadex Gelfiltration in Theorie und Praxis, Pharmacia, Uppsala (1969).
- 18 Sephadex Ionenaustauscher, Pharmacia, Uppsala (1969).
- 19 H. J. Cohn et al., J. Amer. Chem. Soc. 72, 465 (1950).
- 20 G. Wunderer, Diplomarbeit, Naturwiss. Fakultät der TU München, 1972. .

Lebenslauf

Geboren: 24.4.1940 in München

Vater: Rudolf Dittmann, Kaufmann

Mutter: Johanna, geb. Förtner

1946-1950: Volksschule an der Forellenstraße in München

1950-1959: St. Anna Oberrealschule mit Gymnasium, München

1959: Reifeprüfung

1960-1962: Praktikantenzeit als Apothekerpraktikantin in der Troger-Apotheke in München

1963-1966: Studium der Pharmazie am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie an der Universität München (6 Semester)

1966: Staatsexamen der Pharmazie

1967-1968: Kandidatenzeit in der Apotheke des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München

1968: Approbation als Apothekerin

ab So.Sem.
1968: Studium der Medizin

April 1970: Ärztliche Vorprüfung

1971: Arbeiten zur vorliegenden Dissertation

Wi.Sem.73/74: Staatsexamen der Medizin

März 1974: Beginn der Medizinalassistentenzeit

